

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



世界知的所有権機関
国際事務局

(51) 国際特許分類6
C12N 15/06, 5/20, C07K 16/44, G01N
33/53, 33/577

A1

(11) 国際公開番号

WO99/43799

(43) 国際公開日

1999年9月2日(02.09.99)

(21) 国際出願番号	PCT/JP99/00684	藤本 茂(FUJIMOTO, Shigeru)[JP/JP] 〒563-0032 大阪府池田市石橋4丁目11番11号 Osaka, (JP)
(22) 国際出願日	1999年2月17日(17.02.99)	小林綾子(KOBAYASHI, Ayako)[JP/JP] 〒663-8003 兵庫県西宮市上大市4丁目21番23号 Hyogo, (JP)
(30) 優先権データ 特願平10/45185	1998年2月26日(26.02.98)	福田勝二(FUKUDA, Katsuji)[JP/JP] 〒563-0043 大阪府池田市神田4丁目12番9号 Osaka, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒540-8645 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)	JP	(74) 代理人 弁理士 青山 蔦, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 豊田幸生(TOYODA, Yukio)[JP/JP] 〒661-0033 兵庫県尼崎市南武庫荘8丁目29番10号 Hyogo, (JP)		(81) 指定国 BR, CA, CN, IN, JP, KR, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
藤田正憲(FUJITA, Masanori)[JP/JP] 〒565-0862 大阪府吹田市津雲台5丁目6番20号 Osaka, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
郷田泰弘(GODA, Yasuhiro)[JP/JP] 〒567-0855 大阪府茨木市新和町20-25-305 Osaka, (JP)		
宮川権一郎(MIYAGAWA, Ken-ichiro)[JP/JP] 〒563-0103 大阪府豊能郡豊能町東常盤台6丁目6番11号 Osaka, (JP)		

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY FOR IMMUNOLOGICALLY ANALYZING OR CONCENTRATING ENDOCRINE DISRUPTING SUBSTANCE OR ITS DEGRADATION PRODUCT AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称 内分泌擾乱物質またはその分解物の免疫学的分析用または濃縮用モノクローナル抗体およびその用途

(57) Abstract

A hybridoma which produces a monoclonal antibody against an endocrine disrupting substance or its degradation product obtained by fusing spleen cells or lymphoid cells of an animal having been immunized with a complex of the endocrine disrupting substance or a compound similar thereto with a protein with myeloma cells; the monoclonal antibody produced thereby; and a method for immunologically detecting the endocrine disrupting substance or its degradation product and a method for immunologically concentrating the same each by using the above antibody.

内分泌攪乱物質または内分泌攪乱物質類似化合物と蛋白質との複合体で免疫した動物の脾細胞またはリンパ節細胞と、骨髄腫細胞とを融合させて得られる該内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ、それから產生されたモノクローナル抗体、該抗体を用いる内分泌攪乱物質や、その分解物の免疫学的検出方法および免疫学的濃縮方法を開示する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	共和国	TR トルコ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴー	ID インドネシア	MR モーリタニア	UGS ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZB ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	YU ユーロースラビア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュージーランド	ZW シンバabwe
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国	RU ロシア	

明細書

内分泌攪乱物質またはその分解物の免疫学的分析用または濃縮用モノクローナル抗体およびその用途

5

発明の分野

本発明は、内分泌攪乱物質またはその分解物の免疫学的分析用または濃縮用モノクローナル抗体およびその用途に関する。さらに詳しくは、本発明は、該抗体を產生するハイブリドーマ、產生されたモノクローナル抗体、それを用いる、内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物を免疫学的に分析または濃縮するためのキットおよび方法に関する。

背景技術

内分泌攪乱物質は、内分泌攪乱化学物質または環境ホルモンとも称され、近年、それによる環境汚染が問題となっている。そこで、環境中の内分泌攪乱物質やその分解物を測定、分析して、その結果を環境保全に役立たせることが必要となる。

このような内分泌攪乱物質や、その分解物を測定、分析する方法としては、従来から種々の方法が知られている。例えば、上水、河川水、湖沼水または下水中のこれら内分泌攪乱物質および分解物を定量測定するための高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 、ガスクロマトグラフィー (GC) 、ガスクロマトグラフィー-高分解能マススペクトロメトリー (GC-HRMS) 、高速液体クロマトグラフィー-高分解能マススペクトロメトリー (HPLC-HRMS) などがある。

しかしながら、これらは極微量しか存在しない内分泌攪乱物質を定量するには必要な感度が得られないこと、また定量する為には溶媒による抽出等による高倍率の濃縮が必要であること、さらに非常に高価な機器であり操作に習熟を要することなどが問題となっている。これらの問題から、内分泌攪乱物質について、従来より高感度で、迅速かつ簡便で、特異的で、低コストの高感度測定法が望まれている。

上記の問題を解決する手段として酵素免疫測定法（以下、ELISA法と略記することがある）、および免疫学的濃縮法が挙げられる。

ELISA法による、様々な他の環境汚染物質に対する定量系やキットが構築されており、例えば、WO 94/12536号には、環境における石油燃料の検出用のELISA法や、そのキットが開示されている。酵素と抗体で構成されるこれらの分析キットは非常に迅速に、通常、数時間で測定が完了する。また、操作は、従来のHPLC、GC、GC-HRMSやHPLC-HRMSなどよりも非常に簡便である。さらに、抗体、特に、モノクローナル抗体を使用することにより、非常に特異的な定量が可能になる。また、HPLC、GC、GC-HRMSやHPLC-HRMSなどは非常に高価な機器であり、そのメンテナンスにかかる費用もかなりなものであるが、ELISA法にはそのような問題がない。

また、極微量の内分泌擾乱物質、その分解物およびそれらの混合物を精度良く定量するためには、それら物質を高倍率で濃縮することが必要であったが、従来の溶媒抽出法、固相抽出法等では夾雑物が多いために濃縮倍率をある程度以上にはすることが出来なかつたが、抗体、特に、モノクローナル抗体を利用する濃縮方法は、抗原抗体反応を利用するためそのような問題がない。

しかし、内分泌擾乱物質や、その分解物の検出、測定に使用できる免疫学的分析法、特に、ELISA法は未だ確立されておらず、また、内分泌擾乱物質や、その分解物の選択的濃縮に使用できる免疫学的濃縮法も未だ確立されていない。

20

発明の目的

本発明の1つの目的は、内分泌擾乱物質や、その分解物の検出、測定に使用できる免疫学的分析法を提供することである。

本発明の他の目的は、内分泌擾乱物質や、その分解物の選択的濃縮に使用できる免疫学的濃縮法を提供することである。

本発明のこれらの目的ならびに他の目的および効果を、添付の図面を参照して、以下に明らかにする。

図面の簡単な説明

図1は、以下の実施例1(1)において作成した、各化合物に対するハプテンの構造式を示す。

図2は、以下の実施例2で作成したアルキルフェノールエトキシレート類(ノニルフェノールエトキシレート)の標準曲線である。

5 図3は、以下の実施例2で作成した樹脂成分類(ビスフェノールA)の標準曲線である。

図4は、以下の実施例3で作成したアルキルフェノール類(ノニルフェノール)の標準曲線である。

図5は、以下の実施例3で作成したクロロフェノール類(2,4,6-トリクロロフェノール)の標準曲線である。

10 図6は、以下の実施例3で作成したプラスチック可塑剤類(ジブチルフタレート)の標準曲線である。

発明の概要

15 本発明者らは、内分泌攪乱物質であるアルキルフェノールエトキシレート類(以下、APEと略記することがある)、アルキルフェノール類(以下、APと略記することがある)、樹脂成分類(以下、PRCと略記することがある)、樹脂可塑剤類(以下、PPと略記することがある)、クロロフェノール類(以下、CPと略記することがある)や、それらの分解物の免疫学的分析法、特にELISA法による検出、測定法および免疫学的濃縮法を確立すべく、鋭意研究を重ねた。その結果、これら内分泌攪乱物質類似化合物とキャリヤー蛋白質とを結合させ、動物に免疫することにより、その脾臓より坑内分泌攪乱物質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成できることを見出した。また、該モノクローナル抗体と、内分泌攪乱物質、その類似化合物を標識したものを用いて高感度に内分泌攪乱物質およびその分解物を測定できることを見出した。さらに、該モノクローナル抗体に、内分泌攪乱物質、その分解物およびそれらの混合物を抗原抗体反応により選択的に吸着、溶出させることにより、高倍率に濃縮させることができることを見出した。これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、内分泌攪乱物質または内分泌攪乱物質類似化合物と蛋白質との複合体で免疫した動物の脾細胞またはリンパ節細胞と、骨髓腫細胞とを融合させて得られる該内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

5 また、本発明は、本発明のハイブリドーマより産生される内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体を提供するものである。

本発明は、また、本発明のモノクローナル抗体を必須の構成成分としてなることを特徴とする内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的分析用キットも提供する。

10 さらに、本発明は、検体と、担体上に保持された本発明のモノクローナル抗体と、標識剤で標識された内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物とを反応させた後、担体上に保持された標識剤または担体上に保持されなかった標識剤の活性を測定することを特徴とする検体中の該内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的分析方法、特に、ELISA法を提供するものである。

15 本発明は、また、本発明のモノクローナル抗体を必須の構成成分としてなることを特徴とする内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的濃縮キットも提供する。

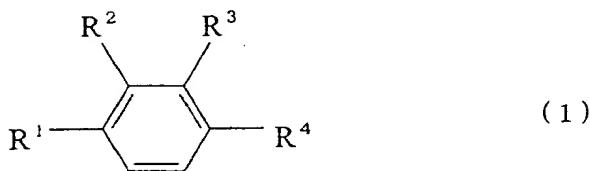
さらに、本発明は、検体を、本発明のモノクローナル抗体との抗原抗体反応に付20 し、該モノクローナル抗体に捕捉させることを特徴とする検体中の該内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的濃縮方法を提供するものである。

25 本発明における、対象となる内分泌攪乱物質は、アルキルフェノールエトキシレート類、アルキルフェノール類、樹脂成分類、樹脂可塑剤類、クロロフェノール類であり、さらには、各種の環境汚染物質、農薬、重金属、合成エストロゲン、食品、食品添加物などであり、本発明によれば、これらの内分泌攪乱物質、その生分解物またはそれらの混合物を、免疫学的に、高感度かつ特異的に分析でき、また高倍率に濃縮することができる。

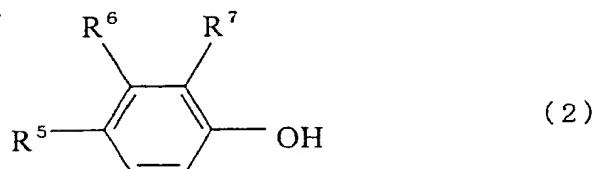
発明の詳細な説明

本発明のハイブリドーマは、内分泌擾乱物質または、その類似化合物と、蛋白質（キャリヤー蛋白質）との複合体を使用し、自体公知の方法に準じて作成できる。

5 用いる内分泌擾乱物質としては、例えば、式（1）：



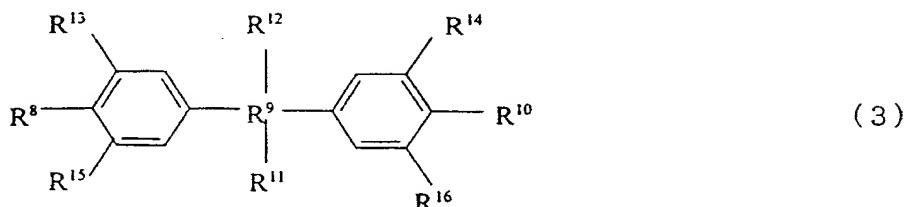
10 [式中、R¹、R²およびR³は同一または異なって、各々、Hまたは炭素数1～20、好ましくは1～12の直鎖または分枝鎖（含sec-、tert-、iso-）アルキル、R⁴は、(OC₂H₄)_mOHまたは(OC₂H₄)_mCOOH、mは酸化エチレン鎖の平均数1～70、好ましくは1～15を意味する]で表されるアルキルフェノールエトキシレート類（APE）[例、NPE（ノニルフェノールエトキシレート、例えば、NP₂EO（平均酸化エチレン鎖数=2）、NP₅EO（平均酸化エチレン鎖数=5）、NP₁₀EO（平均酸化エチレン鎖数=10）、NP₁₀EC（平均酸化エチレン鎖数=10、末端OH→カルボン酸）、OPE（オクチルフェノールエトキシレート）など]、式（2）：



20

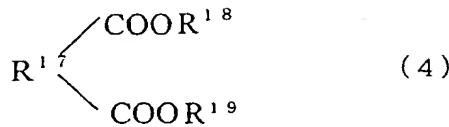
[式中、R⁵、R⁶およびR⁷は、同一または異なって、各々、Hまたは炭素数1～20、好ましくは1～12の直鎖または分枝鎖（含sec-、tert-、iso-）アルキルを意味する]で表されるアルキルフェノール類（AP）、[例、DP（4

ードデシルフェノール)、EP(4-エチルフェノール)、HP(ヘプチルフェノール)、IPP(4-イソペンチルフェノール)、2-OP(2-オクチルフェノール)、4-NP(4-ノニルフェノール)、4-OP(4-オクチルフェノール)、4-sBP(4-sec-ブチルフェノール)、4-tBP(4-t-ブチルフェノール)、4-tPP(4-t-ペンチルフェノール)、4-tOP(4-t-オクチルフェノール)など]、式(3)：

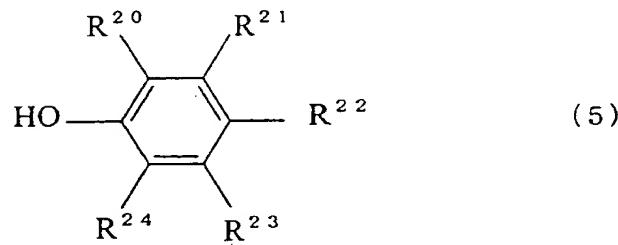


[式中、R⁹はC、COまたはSO₂、R⁸およびR¹⁰は、同一または異なって、各々、H、OH、NH₂またはO(CH₂)₂OH、R¹¹およびR¹²は、同一または異なって、各々、存在せず、H、CH₃、CH₂OHまたはC₂H₄COOH、R¹³、R¹⁴、R¹⁵およびR¹⁶は同一または異なって、各々、H、OH、CH₃、ClまたはBrを意味する]で表される樹脂成分類(PRC) [例、BPA(ビスフェノールA)、4,4'-EBP(4,4'-エチリデンビスフェノール)、BHPM(ビス(p-ヒドロキシフェニル)メタン)、2,2'-BHPP(2,2'-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール)、2,2'-BMHPP(2,2'-ビス(m-メチル-p-ヒドロキシフェニル)プロパン)、4,4'-BHPP(4,4'-ビス(p-ヒドロキシフェニル)ペンタン酸)、4,4'-DDM(4,4'-ジアミノジフェニルメタン)、4,4'-DDE(4,4'-ジヒドロキシジフェニルエーテル)、4,4'-DOHDS(4,4'-ジヒドロキシジフェニルスルфон)、4,4'-DCIDS(4,4'-ジクロロジフェニルスルfon)、BHEDBrPS(ビス[4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3,5-ジプロモフェニル]スルфон)、BHEPS(ビス[4-(2-ヒドロキシエトキシ)フェニル]スルfon)、4,4'-DDE(4,4'-ジヒドロキシデフェニルエーテル)、p,p'-DBP(p,p'-DBP(p,

p' -ジヒドロキシベンゾフェノン)、HBP (4-ヒドロキシビフェニール)など]、式(4)：



[式中、R¹⁷は、o-フェニレンまたはテトラメチレン、R¹⁸およびR¹⁹は、同一または異なって、各々、H、炭素数1～20、好ましくは1～12の直鎖または分枝鎖(含sec-、tert-、iso-)アルキル、ベンジルまたはシクロヘキシルを意味する]で表される樹脂可塑剤類(PP) [例、BPP(フタル酸ブチルベンジル)、DBP(フタル酸ジブチル)、DCHP(フタル酸ジシクロヘキシル)、DEP(フタル酸ジエチル)、DEHP(フタル酸ジ(2-エチルヘキシル))、DEHA(アジピン酸ジエチルヘキシル)、DHP(フタル酸ジヘキシル)、DPP(フタル酸ジ-n-ペンチル)、DPrP(フタル酸ジプロピル)など]、式(5)：



[式中、R²⁰、R²¹、R²²、R²³およびR²⁴は、同一または異なって、各々、HまたはCIを意味する]で表されるクロロフェノール類(CP) [例、2-CP(2-クロロフェノール)、3-CP(3-クロロフェノール)、4-CP(4-クロロフェノール)、2,3-CP(2,3-ジクロロフェノール)、2,4-CP(2,4-ジクロロフェノール)、2,5-CP(2,5-ジクロロフェノール)、2,6-CP(2,6-ジクロロフェノール)、2,3,4-CP(2,3,4-トリクロロフェノール)、2,4,5-CP(2,4,5-トリクロロフェノール)、2,4,6-CP(2,4,6-トリクロロフェノール)、

2, 3, 4, 5-CP (2, 3, 4, 5-テトラクロロフェノール)、2, 3, 4, 6-CP (2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノール)、PCP (ペンタクロロフェノール)など] が挙げられる。これらは、分析または濃縮対象とする内分泌擾乱物質や、分解物に応じて適宜選択できる。

5 また、環境汚染物質 (例、PCB、ベンゾフェノン、ベンゾピラン、クロロベンゼン、プロモナフトール、ニトロトルエン、ダイオキシン、クロロベンゾフラン、トリブチル錫など)、各種農薬、重金属 (例、Cd、Hg、Pbなど)、合成エストロゲン (例、セントクロマン、エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、ヘキセストロール、2-ヒドロキシエストラジオール、タモキシフェン、ラロキシフェンなど)、食品、食品添加物 (例、BHA (ブチルヒドロキシアニソール)、エコール、エンテロラクトン、フィトエストロゲン、クメストロール、ホルモノネチン、ダイゼイン、ビオチニンA、ゲステニンなど) なども、本発明における内分泌擾乱物質に包含される。

15 キャリヤー蛋白質としては、例えば、牛血清アルブミン (以下、BSAと略す)、卵白アルブミン (以下、OVAと略す)、スカシ貝ヘモシアニン (以下、KLHと略す)、牛チログロブリン (以下、BTGと略す) などが挙げられる。

内内分泌擾乱物質またはその類縁化合物と蛋白質との複合体の形成は、例えば、式 (6) :

A-R (6)

20 [式中、Rは、COOH、NH₂またはSHを、Aは、R基の離脱により、内分泌擾乱物質またはその類縁化合物となる基を示す。] で表される化合物を、自体公知の方法により蛋白質に結合させることにより行える。

25 式 (6) で表される化合物も、自体公知の方法で、適宜の原料に、カルボキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基を形成または導入することにより、化学的に合成できる。

例えば、RがCOOHで、Aがポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる式 (6) で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルと無水コハク酸を脱水縮合 (ハーフエステル) することにより製造できる [キャンサ

ー・バイオケミストリー・バイオフィジックス (Cancer Biochem. Biophys.) , 7, 175 (1984)]。

RがNH₂で、Aがポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる式

(6) で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルの水酸基を塩化チオニルにより塩素化した後 [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.) , 60, 2540 (1938)]、アンモニアで処理することにより製造できる [オーガニック・ファンクショナル・グループ・プレパレーションズ (Organic Functional Group Preparations) , 第1巻, 382頁]。

RがSHで、Aがポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる式

(6) で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルの水酸基を塩化チオニルにより塩素化した後 [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.) , 60, 2540 (1938)]、水硫化ナトリウムと反応させることにより製造できる [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.) , 72, 1843 (1950)]。

動物を免疫するには、内分泌攪乱物質または上記で得られた複合体を動物に接種する。接種する動物としては、例えば、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ニワトリなどが用いられるが、内分泌攪乱物質に対するモノクローナル抗体 (以下、MoAbと略記することがある) が所望の場合には、マウスが特に好ましく用いられる。

接種方法としては、通常実施される方法でよく、例えば、マウスに1回に1～100 μg、好ましくは50～100 μgを等容量 (0.1ml) の生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントまたはRIBITMアジュバントシステムで乳化して、背部、腹部の皮下あるいは腹腔内に2～3週毎に3～6回接種する方法がとられる。

これらの免疫動物、例えば、マウスから抗体価の高い個体を選び、最終免疫3～5日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させる。

融合操作は既知の方法に従って実施でき、融合促進剤としては、ポリエチレングリコール（以下、PEGと略す）や、センダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは、PEGが用いられる。

骨髄腫細胞としてはNS-1、P3U1、Sp2/0などが用いられ、特にP3U1が好ましい。例えば、脾細胞と骨髄腫細胞との好ましい比率は1:1～10:1で、これに分子量1,000～6,000のPEGが10～80%の濃度で添加され、20～37°C、好ましくは30～37°Cで3～10分インキュベートするのがよい。

所望の抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには、種々の方法が使用できるが、例えば、内分泌攪乱物質類似化合物（ハプテン）を結合させたOVAを吸着させたマイクロプレートにハイブリドーマ培養上清を添加し、ついで、西洋わさびペルオキシダーゼ（以下、HRPと略す）標識した抗マウス免疫グロブリン抗体を加え、プレート固相に結合した抗体を検出するELISA法などが挙げられる。抗体活性陽性のハイブリドーマを直ちにクローニングに供するが、通常これは限界希釈法などで容易に実施される。

クローン化されたハイブリドーマ上清の抗体価を上記の方法で測定し、安定的に力価の高い抗体を産生するハイブリドーマを選択し、目的とするモノクローナルなハイブリドーマを取得することができる。

以上のような方法で作成した抗内分泌攪乱物質抗体産生ハイブリドーマの例として、後の実施例に示すマウスハイブリドーマMOF3-139、AP-14、BP2-177、DF-34、CP-8が挙げられる。

これらのハイブリドーマより産生される内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体も本発明の範囲のものである。

ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の産生、精製も自体公知の方法で行える。得られたモノクローナル抗体は、該内分泌攪乱物質、その分解物のみならず、式(6)で表される化合物に対する抗体となる。

得られたモノクローナル抗体は、例えば、「代謝」、Vol. 8, 696 (1971)に記載されているプロムシアン法、グルタルアルデヒド（以下、GLAと略す）法、カルボジイミド法、エポキシ活性化法などの公知の方法により、固相抗

体または免疫吸着体とすることができます。また、より簡便で好ましい方法として、抗体を、96 ウエル・マイクロプレートや、試験管、ガラス粒子、ポリスチレン・ラテックス、ポリスチレン粒子上に物理的に吸着させる方法、イムノクロマト法を利用した方法などがある。

5 これらを、例えば、ELISA 用の酵素剤や、緩衝剤等と組み合わせて、内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的分析用キットまたは免疫学的濃縮用キットとすることができます、かかるキットも本発明範囲のものである。

本発明の免疫化学的分析方法においては、検体（例、内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物を含有する水や土壤試料）と、既知の量の標識された内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物との、本発明のモノクローナル抗体に対する結合の量的な競合反応によって定量するいわゆる競合法が用いられる。競合法においては、未知の抗原を含む検体液に、担体上に保持された一定量の抗体を加え、さらに標識剤で標識した一定量の抗原を加える。担体上に保持された標識剤または担体上に保持されなかった標識剤の活性を測定する。抗体と標識された抗原の添加は、ほぼ同時に行なうことが望ましい。

この競合法は、一般にサンドウィッヂ法などに比べて、操作が簡便で比較的短時間での測定が可能である。

抗原を標識する標識剤としては、放射性同位元素（以下、RI と略す）、酵素、酵素基質、蛍光物質、ビオチンなどが挙げられる。これら抗原と標識剤の結合には、マレイミド法〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.），20 79, 233 (1976)〕、活性化ビオチン法〔ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー（J. Am. Chem. Soc.），100, 3585 (1978)〕などが用いられる。

25 例えば、内分泌攪乱物質の場合、競合法による特異的免疫化学的測定方法を実施するには、未知量の内分泌攪乱物質を含有する被検試料に公知の常套手段で物理的または化学的に抗体を結合させた固相を加えて反応させる。また、同時に標識剤で標識した抗原の一定量を加えて反応させる。つぎに、通常、固相をよく洗浄し、固相上に結合している標識剤の活性を測定する。標識剤が RI である場合、ウェル・カウンターまたは液体シンチレーション・カウンターで測定する。標識

剤が酵素である場合、基質を加えて放置し、比色法もしくは蛍光法で酵素活性を測定する。標識剤が蛍光物質、発光物質であっても、それぞれ公知の方法に従つて測定する。

本発明の方法においては、特異性の高いモノクローナル抗体を用いているので、
5 A P E の場合には、A P E およびそれらの分解物以外の化合物、例えば、トルエン、フェノール、ベンゼン、アニリンなどベンゼン環をもつような化合物または他の内分泌攪乱物質について、交叉反応で誤って測定してしまうことはなく、非常に特異的にA P E およびそれらの分解物を定量することができるという極めて優れた特色を有するものである。

10 かくして、本発明では、内分泌攪乱物質や、その分解物に非常に特異的な抗体を用いることによって、検体中の他の化学物質による影響を排除できるので、高感度に、かつ特異的に、簡便に測定が行え、学術上での分析はもとより、環境保全等における内分泌攪乱物質、その分解物の影響等の調査等に有用である。

また、本発明の免疫学的濃縮方法においては、大量の検体を、免疫吸着体カラムを通過させたり、免疫吸着体粒子と混合したりすることにより、抗原抗体反応を利用して、目的の内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物を、免疫吸着体に捕捉させ、ついで、p H の変更 (p H 2. 5~3 に下げる、p H 11. 5 に上げるなど)、イオン強度の変更 (1 M N a C l など)、極性の変更 (1 0 % ジオキサン、5 0 % エチレングリコール、3 M カオトロピック塩 (S C N ⁻、
20 C C l ₃ C O O ⁻、I ⁻ など)、蛋白変性剤 (8 M 尿素、6 M 塩酸グアニジンなど) の添加や、電気泳動による解離など公知の方法で溶出させることにより、免疫学的に夾雑物の少ない目的物質を、数千から数万倍もの高倍率に濃縮できる。

これにより、環境中に極く微量しか存在しない内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物を、溶媒抽出法や固層抽出法などの従来の濃縮方法と比較して、はるかに高倍率に濃縮することができ、しかも定量を妨害する夾雑物等の含量の少ない濃縮液を得ることができる。

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、これらは、本発明の範囲を限定するものではない。

なお、以下の実施例は、内分泌攪乱物質であることが知られている、アルキル

フェノールエトキシレート類 (A P E) 、アルキルフェノール類 (A P) 、樹脂成分類 (P R C) 、樹脂可塑剤類 (P P) 、クロロフェノール類 (C P) についてのものであるが、これらは同様に他の内分泌攪乱化学物質にも適用できる。

実施例におけるそれぞれのマウスハイブリドーマは、ブダペスト条約の下、
5 日本国茨城県つくば市東1-1-3の通商産業省工業技術院 生命工学工業技術研究所 (N I B H) に寄託しており、以下の表にそれらの寄託日および受託番号を示す。

モノクローナル抗体	ハイブリドーマ	受託番号	寄託日
抗APE抗体	MOF3-139	FERM BP-6059	1997年8月13日
抗AP抗体	AP-14	FERM BP-6633	1999年2月 2日
抗PRC抗体	BP2-177	FERM BP-6634	1999年2月 2日
抗PP抗体	DF-34	FERM BP-6635	1999年2月 2日
抗CP抗体	CP-8	FERM BP-6636	1999年2月 2日

10 実施例 1

ハプテンモノクローナル抗体の取得

(1) ハプテンの作成

1) アルキルフェノールエトキシレート類抗体用ハプテンおよびアルキルフェノール類抗体用ハプテンの作成

15 ポリエチレングリコールモノノニルフェニルエーテル (N P 5 E O) 5. 0 g をトルエン 60 ml に溶解し、無水コハク酸 918 mg 、p-トルエンスルホン酸 16 mg と、窒素雰囲気下、80°Cにて2時間反応させた。反応液をアルカリ条件下 (pH 12) でエーテル洗浄後、酸性条件下 (pH 2) でクロロホルム抽出した。抽出液を脱水、蒸発乾固して目的物質 2. 1 g を得た。

20 2) 樹脂成分類抗体用ハプテンの作成

ビスフェノールA 25 g とグルタル酸無水物 12. 5 g を窒素雰囲気下、100°Cにて18時間反応させた。反応物を酢酸エチルに溶解し、シリカゲルカラム、オクタデシルシリカゲル (O D S) カラムで精製後、ヘキサンにて結晶化させて目的物質 2. 1 g を得た。

3) 樹脂可塑剤抗体用ハプテンの作成

8-ブロモオクタン酸10gをテトラヒドロフラン300mlに溶解後、ジフェニルアミノメタン20mlを添加し、室温で一晩反応させた。翌日、さらにジフェニルアミノメタン20mlを添加し、さらに室温で一晩反応させた。減圧濃縮後、反応物をヘキサン-酢酸エチル(9:1)に溶解し、シリカゲルカラムで粗精製した。

この粗精製物20gと、フタル酸2.42g、1,8-ジアザビシクロウンデンセン(DBU)2.22gとをベンゼン60ml中で一晩加熱還流した。翌日、DBU2.22gを添加後、さらに6時間加熱還流し、室温に冷却後、水、クロロホルムを加え、水洗した。クロロホルム層を脱水、濃縮後、ヘキサン-酢酸エチル(9:1)に溶解し、シリカゲルカラムにて粗精製した。

この粗精製物4.1gをテトラヒドロフラン(THF)100mlに溶解し、10%Pd/C(50%含水品)0.4gを添加した。H₂吹き込み(0.3ml/分、5時間)後、10%Pd/C1.2gを追加した。さらにH₂吹き込み(0.5ml/分、2時間)後、触媒を除去し、減圧濃縮した。75%メタノールに溶解後、ODSカラムにて精製し、目的物質1.9gを得た。

4) クロロフェノール類抗体用ハプテンの作成

5-ブロモ吉草酸50gとトリフェニルホスフィン72.5gをトルエン400ml中で一晩加熱還流後、濾過し、固体をトルエンで洗浄し、減圧乾燥してホスホニウム塩120gを得た。別途、p-ヒドロキシベンズアルデヒド25gを酢酸125mlに溶解し(35°C)、50°Cに温度を上げ、塩素ガスを2時間吹き込んだ。室温まで放冷し(35°C)、白色結晶19gを得た。この結晶19gと酢酸36gを混合後、80°Cに加熱し、濃厚なスラリー状になるまで塩素ガスを吹き込んだ。室温まで放冷後、析出した白色結晶をクロロホルムから再結晶させ、3,5-ジクロロ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド9.3gを得た。次に、この結晶9gと上記のホスホニウム塩31.3gおよびt-ブタノール15.5mlをトルエン210mlに溶解し、50°Cまで加熱した時点でt-BuOK 23.7gを添加した。55°Cで5時間反応させた後、室温でさらに一晩反応させた。反応液を氷中に投入し、トルエン層を捨て、残った液のpHを2に調整した。酢

酸エチルで抽出後、減圧乾燥し、ヘキサン-酢酸エチル（9:1）に溶解し、シリカゲルカラムで精製し、精製物5.3gを得た。この精製物2.55g、10%Pd/C（50%含水品）0.36g、水30mlおよびメタノール60mlを混合後、水素を吹き込んだ（0.2リットル/分、20分）。触媒を除去し、減圧濃縮し、イソプロピルエーテル（IPE）で抽出した。減圧濃縮後、シリカゲルカラム、ODSカラムで精製した。精製物をエーテル/ヘキサンで再結晶させ、目的物質1.7gを得た。

（2）免疫原の調製

各ハプテン0.1モル、水溶性カルボジイミド0.14モル、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.14モルをジメチルスルフォキシド2ml中で室温で一晩反応させて、活性化エステルを作成した。次に、牛血清アルブミン（BSA）10mgを0.13モル重炭酸ナトリウム（NaHCO₃）溶液に溶解し、本活性化エステル200μlを添加後、一晩4°Cで反応させた。限外濾過により未反応の試薬を除去し、免疫原として凍結保存した。

（3）免疫

各ハプテンとBSAの複合体を500μg/mlとなるように生理食塩水に溶解し、等量のフロイントアジュバントまたはRIBIアジュバントに添加した。充分乳濁後、BALB/Cマウス（メス）に100μg/マウスで皮下投与し、2週間（フロイント）もしくは3週間（RIBI）間隔で追加免疫を実施した。5～6回の追加免疫後、最大の血清抗体価を示した個体について同じ複合体溶液（5～10μg/0.1ml生理食塩水/マウス）を静脈投与し最終免疫とした。

（4）細胞融合

最終免疫から3日後、マウスの腹腔中から脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を常法により調製した（約10⁸個）。ついで、血清無添加培地で3回洗浄したマウス骨髓腫細胞（P3U1）2×10⁷個を添加し、PEG6000を用いてケーラーとミルスタインの方法[Nature, 256, 495(1975)]に準じて細胞融合に供した。

融合終了後、細胞混液をヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジンを含むいわゆるHAT培地中に懸濁し、10日間培養した。10日間の培養期間中に脾臓由来の細胞は自然に死滅し、HAT培地により脾細胞と融合しなかったマウス骨

腫瘍細胞（P3U1）も死滅した。培地中に生存した細胞をハイブリドーマとし、以後はHAT培地からアミノブテリンを除いたHT培地にて培養を続けた。

（5）ハイブリドーマの一次選択およびクローニング

免疫原と同様の方法で作成した各化合物のハプテンとOVAの複合体（ハプテン-OVA）を吸着させたマイクロプレートを用いるELISA法によりハイブリドーマ培養上清の抗体価を測定した。融合10日から20日後にハイブリドーマの出現を認め、かつハプテン-OVAに結合する抗体の出現が認められた。特に産生抗体の結合活性が強いハイブリドーマについて、限界稀釈法によるクローニングに供した。

（6）ハイブリドーマの二次選択

（5）の方法で取得した各ハイブリドーマについて、対象化合物（アルキルフェノールエトキシレート類、アルキルフェノール類、樹脂成分類、樹脂可塑剤類、クロロフェノール類等）を培養上清に加えて、ハプテン-OVAプレートを吸着させたマイクロプレートへの結合能の阻害を調べる阻害試験を行い、各対象化合物のみにより結合が阻害されるものを選択した。

以上 の方法により、各対象化合物に特異的に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得した。

（7）モノクローナル抗体の作成

クローン化されたハイブリドーマを、10%ウシ牛胎児血清を含むダイゴT培地（日本製薬 東京）中、37°C、5%二酸化炭素濃度のインキュベーターを用いて培養し、その上清より抗体を得た。

一方、多量の抗体を得るために、予め0.5mlの鉱油を腹腔内投与したBALB/Cマウスに 5×10^6 個のハイブリドーマを腹腔内接種した。細胞を接種したマウスは約10日後に腹水の貯留が見られた。腹水の貯留したマウスを開腹し、腹腔内より腹水を採取した。

抗体の精製は常法により、細胞培養上清または腹水上清より45~50%飽和硫酸アンモニウムで分画後、プロテインAクロマトグラフィーにて精製した。

実施例2

抗体固相化法によるアルキルフェノールエトキシレート類（APE）および樹

脂成分類 (P R C) の測定

抗A P Eモノクローナル抗体および抗P R Cモノクローナル抗体を用いた抗体固相化法による測定例を以下に示す。

(1) 抗原酵素複合体の作成

5 常法に従い、A P EおよびP R Cハプテンの活性化エステルと西洋ワサビペルオキシダーゼを結合後、限外ろ過にて未反応物質を除去し、各抗原酵素複合体を作成した。

(2) 標準曲線

10 標準液と抗原酵素複合体溶液を混合後、各抗体を固相化したプレートに添加した。60～90分反応させた後、発色基質液を添加し、吸光度を測定した。標準物質として使用したノニルフェノールエトキシレート (N P E) およびビスフェノールA (B P A) の標準曲線を図2および図3に示す。測定範囲はアルキルフェノールエトキシレート類では50～2000 μ g/リットル、樹脂成分類では50～500 μ g/リットルであった。

15 実施例3

抗原固相化法によるアルキルフェノール類 (A P) 、クロロフェノール類 (C P) 、樹脂可塑剤類 (P P) の測定

抗A P 、C P 、P Pモノクローナル抗体を用いた抗原固相化法による測定例を以下に示す。

20 (1) 標準曲線

標準液と各抗体溶液を混合後、ハプテン-O V A固相化プレートに添加した。60分間37°Cで反応後、酵素標識二次抗体を添加し、60分間37°Cで反応させた。発色基質を添加し、その吸光度を測定した。

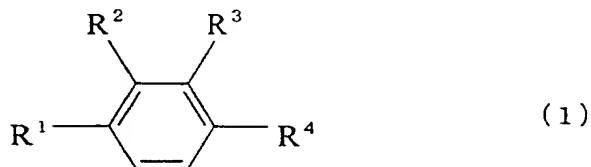
25 測定範囲はアルキルフェノール類 (標準物質:ノニルフェノール) で0.5～30 mg/リットル (図4) 、クロロフェノール類 (標準物質:2, 4, 6-トリクロロフェノール) で30～500 mg/リットル (図5) 、樹脂可塑剤類 (標準物質:ジブチルフタレート) で0.1～30 mg/リットル (図6) であった。

請求の範囲

1. 内分泌攪乱物質または内分泌攪乱物質類似化合物と蛋白質との複合体で
免疫した動物の脾細胞またはリンパ節細胞と、骨髄腫細胞とを融合させて得られ
5 該内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体を産生するハ
イブリドーマ。

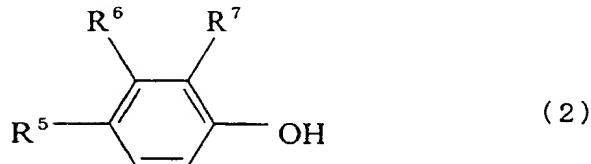
2. 内分泌攪乱物質が、アルキルフェノールエトキシレート類、アルキルフ
エノール類、樹脂成分類、樹脂可塑剤類、クロロフェノール類である請求項1記
載のハイブリドーマ。

10 3. 内分泌攪乱物質が、式(1)：



15 [式中、R¹、R²およびR³は同一または異なって、各々、Hまたは炭素数1～
20の直鎖または分枝鎖アルキル、R⁴は、(OC₂H₄)_mOHまたは
(OC₂H₄)_mCOOH、mは酸化エチレン鎖の平均数1～70を意味する]で
表されるアルキルフェノールエトキシレート類である請求項2記載のハイブリド
ーマ。

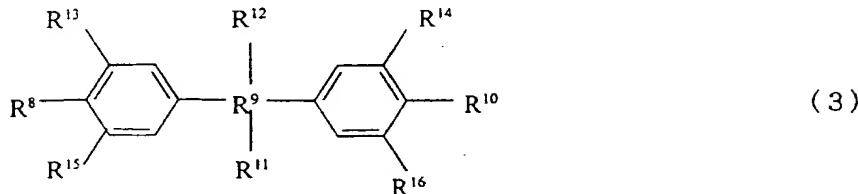
20 4. 内分泌攪乱物質が、式(2)：



[式中、R⁵、R⁶およびR⁷は、同一または異なって、各々、Hまたは炭素数1～20の直鎖または分枝鎖アルキルを意味する]で表されるアルキルフェノール類である請求項2記載のハイブリドーマ。

5. 内分泌攪乱物質が、式(3)：

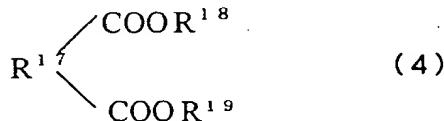
5



[式中、R⁹はC、COまたはSO₂、R⁸およびR¹⁰は、同一または異なって、各々、H、OH、NH₂またはO(CH₂)₂OH、R¹¹およびR¹²は、同一または異なって、各々、存在せず、H、CH₃、CH₂OHまたはC₂H₄COOH、R¹³、R¹⁴、R¹⁵およびR¹⁶は同一または異なって、各々、H、OH、CH₃、CIまたはBrを意味する]で表される樹脂成分類である請求項2記載のハイブリドーマ。

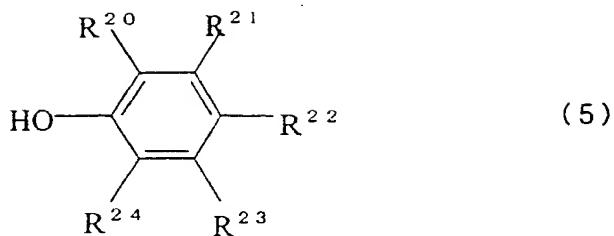
6. 内分泌攪乱物質が、式(4)：

15



[式中、R¹⁷は、o-フェニレンまたはテトラメチレン、R¹⁸およびR¹⁹は、同一または異なって、各々、H、炭素数1～20の直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジルまたはシクロヘキシルを意味する]で表される樹脂可塑剤類である請求項2記載のハイブリドーマ。

7. 内分泌攪乱物質が、式(5)：



[式中、R²⁰、R²¹、R²²、R²³およびR²⁴は、同一または異なって、各々、HまたはC1を意味する]で表されるクロロフェノール類である請求項2記載のハイブリドーマ。

8. マウスハイブリドーマが、MOF 3-139、AP-14、BP 2-177、DF-34、CP-8のうちのいずれかである請求項1記載のハイブリドーマ。

9. 内分泌攪乱物質または内分泌攪乱物質類似化合物と蛋白質との複合体で免疫した動物の脾細胞またはリンパ節細胞と、骨髄腫細胞とを融合させて得られる該内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより産生される内分泌攪乱物質またはその分解物に対するモノクローナル抗体。

10. 内分泌攪乱物質が、アルキルフェノールエトキシレート類、アルキルフェノール類、樹脂成分類、樹脂可塑剤類、クロロフェノール類である請求項9記載のモノクローナル抗体。

11. 内分泌攪乱物質が、請求項3の式(1)で表されるアルキルフェノールエトキシレート類である請求項10記載のモノクローナル抗体。

12. 内分泌攪乱物質が、請求項4の式(2)で表されるアルキルフェノール類である請求項10記載のモノクローナル抗体。

13. 内分泌攪乱物質が、請求項5の式(3)で表される樹脂成分類である請求項10記載のモノクローナル抗体。

14. 内分泌攪乱物質が、請求項6の式(4)で表される樹脂可塑剤類である請求項10記載のモノクローナル抗体。

15. 内分泌攪乱物質が、請求項7の式(5)で表されるクロロフェノール

類である請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

16. マウスハイブリドーマが、M OF 3-139、AP-14、BP 2-177、DF-34、CP-8のうちのいずれかである請求項 9 記載のモノクローナル抗体。

5 17. 請求項 9 ~ 16 いずれか 1 項記載のモノクローナル抗体を必須の構成成分としてなることを特徴とする内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的分析用キット。

10 18. 検体と、担体上に保持された請求項 9 ~ 16 いずれか 1 項記載のモノクローナル抗体と、標識剤で標識された内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物とを反応させた後、担体上に保持された標識剤または担体上に保持されなかった標識剤の活性を測定することを特徴とする検体内の該内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的分析方法。

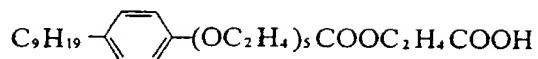
15 19. 請求項 9 ~ 16 いずれか 1 項記載のモノクローナル抗体を必須の構成成分としてなることを特徴とする内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的濃縮用キット。

20. 検体中の内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物を、担体上に保持された請求項 9 ~ 16 いずれか 1 項記載のモノクローナル抗体に捕捉させた後に溶出することにより濃縮することを特徴とする検体内の該内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物の免疫学的濃縮方法。

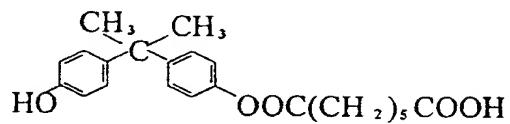
図 1

各化合物に対するハプテンの構造式

1. APE, AP 抗体用



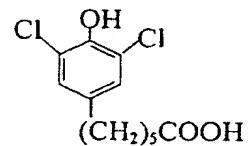
2. PRC 抗体用



3. PP 抗体用



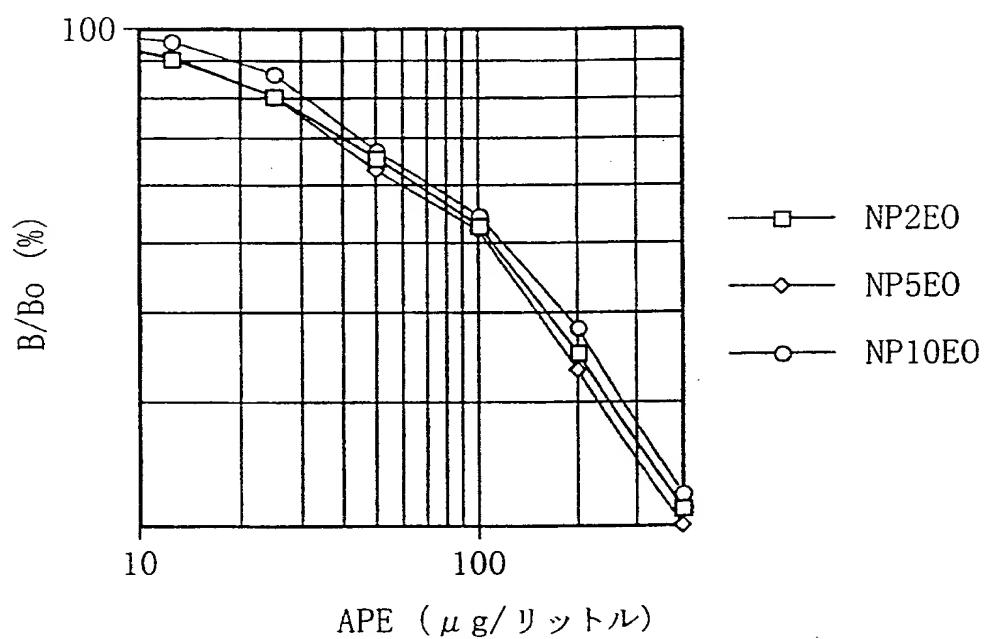
4. CP 抗体用



2/6

図 2

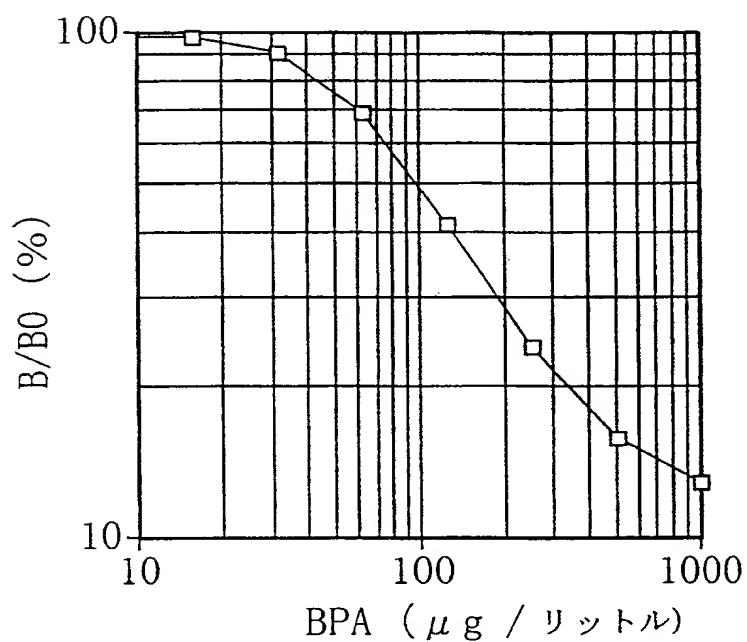
アルキルフェノールエトキシレート類の定量（抗体固相化法）



3/6

図 3

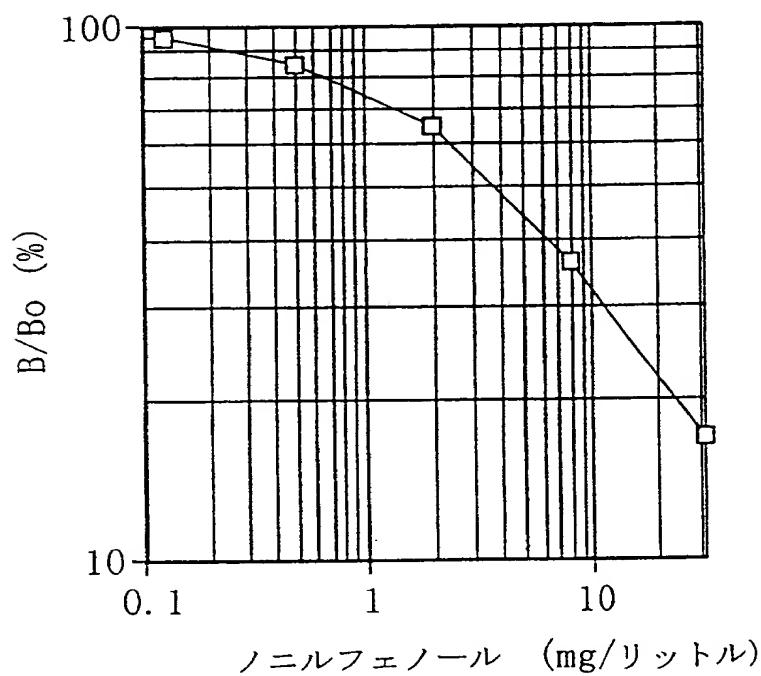
プラスチック樹脂成分類の定量（抗体固相化法）



4/6

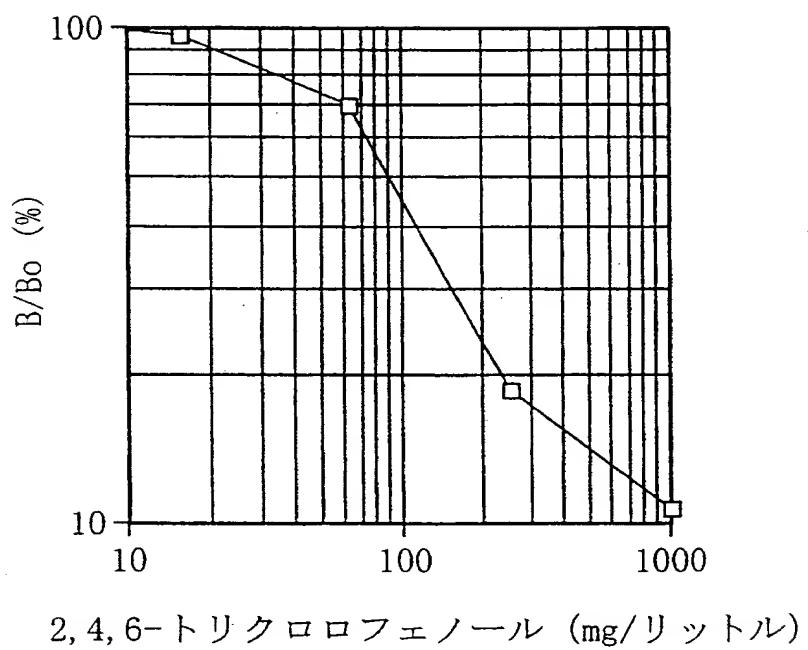
図 4

アルキルフェノール類の測定（抗原固相化法）



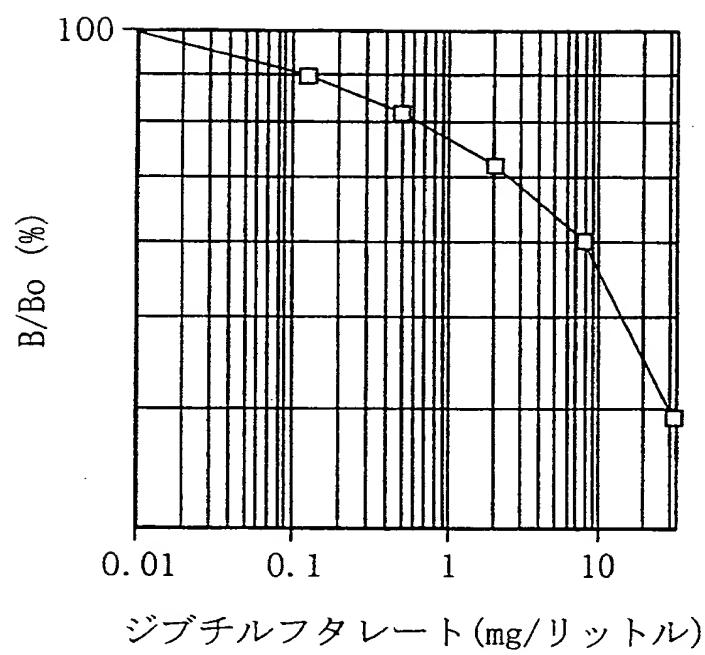
5/6

図 5



6/6

図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁶ C12N15/06, C12N5/20, C07K16/44, G01N33/53, G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/06, C12N5/20, C07K16/44, G01N33/53, G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 63-126494, A (Westinghouse Electric Corp.), 30 May, 1988 (30. 05. 88) & EP, 260829, A & AU, 8778118, A & NO, 8703774, A	1, 2, 7-10, 15-20
X	HARRISON, P.T.C. et al., "Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?", The Science of the Total Environment (1997) Vol. 205, Nos. 2, 3 p.97-106	1-3, 5, 6, 8-11, 13, 14, 16-20
X	SAFE, S.H et al., "Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds", Environ. Toxicol. Chem. (Jan. 1998) Vol. 17, No. 1 p.119-126	1, 2, 4, 8-10, 12, 16-20

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 14 May, 1999 (14. 05. 99)	Date of mailing of the international search report 25 May, 1999 (25. 05. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int Cl⁶ C12N15/06, C12N5/20, C07K16/44,
G01N33/53, G01N33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int Cl⁶ C12N15/06, C12N5/20, C07K16/44,
G01N33/53, G01N33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 63-126494, A (ウェスチングハウス・エレクトリック・コーポレーション) 30.5月. 1988 (30.05.88) &EP, 260829, A &AU, 8778118, A &NO, 8703774, A	1, 2, 7-10, 15-20
X	HARRISON, P. T. C. et al. "Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?", The Science of the Total Environment (1997) 第205巻, 第2-3号 p. 97-106	1-3, 5, 6, 8-11, 13, 14, 16-20
X	SAFE, S. H et al. "Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds", Environ. Toxicol. Chem. (Jan. 1998) 第17巻, 第1号 p. 119-126	1, 2, 4, 8-10, 12, 16-20

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 05. 99

国際調査報告の発送日

25.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鶴飼 健

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)